



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de los espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) evaluado mediante citometría de flujo

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

María Mercedes PÉREZ ROSALES

ASESOR

Alexei Vincent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pérez, M. Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de los espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) evaluado mediante citometría de flujo [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

AUTOR: MARÍA MERCEDES PÉREZ ROSALES

CODIGO ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-7206-4052>

DNI:44311342

ASESOR: ALEXEI VINCENT SANTIANI ACOSTA

CODIGO ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-9740-5490>

Grupo de investigación:

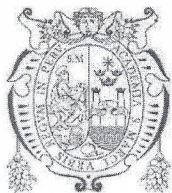
Grupo de investigación en reproducción y sanidad animal (GIRESA)

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:

Facultad de Medicina Veterinaria, Avenida Circunvalación 28, San Borja 15021

Año que la investigación abarcó:

Enero, Febrero, Marzo, Abril y Mayo del 2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el **miércoles 19 de diciembre de 2018**, a las **14:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0266-EPMV/FMV-2018, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg.	Wilfredo Huanca López	Presidente del Jurado
MV. Dr.	Alexei Vicent Santiani Acosta	Asesor de la Tesis
Ing. Mg.	Juan Pavel Olazábal Loaiza	Miembro del Jurado
MVZ.	Olger Pedro Ramos Coaguila	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **PÉREZ ROSALES, MARÍA MERCEDES** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA INTEGRIDAD ACROSOMAL DE LOS ESPERMATOZOIDES VIABLES DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EVALUADO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO”,


Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **15:15 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Wilfredo Huanca López: MV. Mg. Prof. Principal D.E.


Alexei Vicent Santiani Acosta: MV. Dr. Prof. Principal T.P


Juan Pavel Olazábal Loaiza: Ing. Mg. Prof. Asociado T.C.


Olger Pedro Ramos Coaguila: MVZ. Prof. Asociado D.E.



DEDICATORIA

A mis padres que siempre me impulsaron a ser una mejor persona y me apoyaron incondicionalmente en cada etapa de mi carrera.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Alexei Santiani por apoyarme en todo momento para concluir exitosamente esta tesis.

A Brian Román y a todo el equipo del laboratorio de reproducción animal, por el apoyo y las experiencias aprendidas.

A mis padres y hermanos, que sin su incondicional apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí.

A Ferenc por ser mi apoyo en cada momento y ayudarme a superar cada obstáculo que se nos presente.

INDICE DE CONTENIDO

	PÁG
RESUMEN.....	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1- Inseminación artificial en alpacas.....	4
2.2- Características de espermatozoides epididimarios	5
2.3- Criopreservación del semen	7
2.3.1.- <i>Proceso de congelamiento del semen</i>	7
2.4.- Daños en el proceso de criopreservación	7
2.4.1.- <i>Shock térmico durante el proceso de criopreservación</i>	7
2.4.2.- <i>Daños físicos y químicos a los espermatozoides</i>	8
2.4.3.- <i>Daños a las membranas celulares</i>	9
2.4.4.- <i>Daño oxidativo</i>	10
2.5.- Criopreservación de espermatozoides de alpaca	11
2.6.- Evaluación de viabilidad espermática y membrana acrosomal por citometría de flujo.	12
2.6.1.- <i>Importancia de la viabilidad y la integridad acrosomal en espermatozoides</i>	12
2.6.2.- <i>Marcadores de daño acrosomal</i>	13
2.6.3.- <i>Citometría de flujo para análisis seminal.</i>	14
2.6.4.- <i>Citometría de flujo y evaluación de viabilidad e integridad acrosomal.</i>	15
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Lugar de estudio	17
3.2. Tamaño muestral.....	17
3.3. Obtención de muestras.....	18
3.3.1. <i>Preparación del dilutor</i>	18
3.3.2. <i>Recuperación de espermatozoides epididimarios</i>	18
3.3.3. <i>Evaluación de calidad seminal (motilidad y concentración)</i>	19
3.3.4. <i>Criopreservación</i>	19
3.3.5. <i>Descongelamiento</i>	20
3.3.6. <i>Evaluación de la motilidad post descongelamiento</i>	20
3.3.7. <i>Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides viables</i>	20
3.3.8. <i>Citometría de flujo</i>	20
3.3.9. <i>Controles de fluorescencia</i>	22

3.3.10. <i>Diseño experimental y observacional</i>	25
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	35
VII. BIBLIOGRAFIA	36

RESUMEN

Con el fin de obtener óptimos protocolos de criopreservación de espermatozoides de alpaca, es necesario conocer como se ve afectada la capacidad fecundante de los espermatozoides después del descongelamiento. La integridad acrosomal de los espermatozoides viables es uno de los factores que determina la capacidad fecundante del espermatozoide. En tal sentido, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal de los espermatozoides viables de alpaca recuperados del epidídimo, determinado mediante citometría de flujo. Se procesaron muestras de 46 testículos de alpaca obtenidos de Camal Municipal de Ninacaca, Pasco, que presentaron una motilidad $\geq 30\%$ y concentración espermática $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides/mL, en promedio 46.6% y 61×10^6 espermatozoides/mL, respectivamente del total de las muestras obtenidas. Los espermatozoides se recuperaron de la cola del epidídimo con 1mL de dilutor a base de leche descremada, yema de huevo, fructuosa y DMA; separándose luego en 2 alícuotas de 500 μ L. La primera alícuota se utilizó para la evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal inicial y la segunda alícuota se congeló en pajillas mediante un sistema automático de criopreservación, para luego almacenarse en nitrógeno líquido hasta el día de su evaluación. Todas las muestras, frescas y descongeladas fueron lavadas 2 veces por centrifugación con solución PBS para retirar el dilutor. Para la evaluación de viabilidad e integridad acrosomal, 100 μ L de cada muestra fue incubada con 2.5 μ L de FITC-PSA (100 μ g/mL) y 0.5 μ L de Ioduro de Propidio (PI, 2.4 nM) por 10 minutos a 38°C, obteniendo finalmente una concentración de 2.5 μ g/mL y 12 μ M, respectivamente. Inmediatamente después las muestras se evaluaron por citometría de flujo con analizador de imágenes, adquiriéndose diez mil eventos compatibles con espermatozoides por muestra. FITC-PSA y PI fueron excitados con el láser de 488 nm, mientras que la emisión de fluorescencia fue detectada utilizando los canales Ch02 (505-560 nm) para FITC-PSA y Ch05 (642-740nm) para PI. Se seleccionó la población de espermatozoides viables (PI negativos), que en promedio fue el 75% del semen fresco y un 42% del semen descongelado, para de ellos determinar el porcentaje de integridad acrosomal (FITC-PSA negativos) y de reacción acrosomal (FITC-PSA positivos). Se realizó un análisis de T-student pareado para determinar como la criopreservación afecta la integridad acrosomal en los espermatozoides viables. Se encontró que la integridad acrosomal de los espermatozoides viables inicial ($98.25 \pm 5.40\%$) fue similar ($p > 0.05$) a la integridad acrosomal de los espermatozoides viables post descongelamiento ($98.75 \pm 2.17\%$). Se concluye que si bien la criopreservación disminuye la cantidad de espermatozoides viables, la estructura acrosomal no se altera en los espermatozoides de alpaca que sobreviven a este proceso.

Palabras clave: alpaca, espermatozoides, viabilidad e integridad acrosomal, FITC-PSA, Ioduro de Propidio, Citometría de flujo

ABSTRACT

To obtain optimal alpaca sperm cryopreservation protocols, it is necessary to know how the fertilizing capacity of spermatozoa after thawing is affected. The acrosomal integrity of viable sperm is one of the factors that determines the fertilizing capacity of spermatozoa. In this regard, the objective of this study was to determine the effect of cryopreservation on the acrosomal integrity of viable alpaca sperm recovered from the epididymis, determined by flow cytometry. Samples from 46 alpaca testicles obtained from The Municipal Slaughterhouse of Ninacaca, Pasco, were analyzed. They showed motility $\geq 30\%$ and sperm concentration $\geq 50 \times 10^6$ spermatozoa / ml, on average 46.6% and 61×10^6 spermatozoa / mL, respectively, of the total samples obtained. The spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis with 1ml of dilutor based on skimmed milk, egg yolk, fructose and DMA; then separated in 2 aliquots of 500 μ l. The first aliquot was used for the evaluation of the initial viability and acrosomal integrity and the second aliquot was frozen in straws by means of an automatic cryopreservation system, and then stored in liquid nitrogen until the day of its evaluation. All samples, fresh and thawed, were washed twice by centrifugation with PBS solution to remove the dilutor. For the evaluation of viability and acrosomal integrity, 100 μ l of each sample was incubated with 2.5 μ l of FITC-PSA (100 μ g / ml) and 0.5 μ l of propidium iodide (PI, 2.4 nM) for 10 minutes at 38 ° C, to reach a final concentration of 2.5 μ g / ml and 12 μ M, respectively. Immediately afterwards the samples were evaluated by flow cytometry with image analyzer, acquiring ten thousand events compatible with sperm per sample. FITC-PSA and PI were excited with the 488 nm laser, while the fluorescence emission was detected using the Ch02 channels (505-560 nm) for FITC-PSA and Ch05 (642-740nm) for PI. The viable sperm population (PI negative) was selected, which on average was 75% of fresh semen and 42% of thawed semen, for them to determine the percentage of acrosomal integrity (FITC-PSA negative) or acrosomal reaction (FITC-PSA positive). A paired T-student analysis was performed to determine how cryopreservation affects acrosomal integrity in viable sperm. It was found that the acrosomal integrity of the initial viable spermatozoa ($98.25 \pm 5.40\%$) was similar ($p > 0.05$) to the acrosomal integrity of viable post-thaw sperm ($98.75 \pm 2.17\%$). It is concluded that although cryopreservation decreases the amount of viable sperm, the acrosomal structure is not altered in alpaca sperm that survives this process.

Keywords: alpaca, spermatozoa, viability, acrosomal integrity, FIT-PSA , propidium iodide, flow cytometry.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Investigaciones realizadas en criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos en los últimos años, métodos utilizados y los diferentes resultados obtenidos. -----	11
Tabla 2. Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov para integridad acrosomal de espermatozoides viables y motilidad. Pruebas estadísticas para análisis de los parámetros de Integridad acrosomal en espermatozoides viables y motilidad. -----	26
Tabla 3. Espermatozoides epididimarios de alpacas, frescos y descongelados, analizados con los fluorocromos FITC-PSA y PI para evaluar integridad acrosomal de los espermatozoides viables -----	27
Tabla 4. Evaluación de la motilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides viables mediante el estudio estadístico de t- student pareado y la prueba de Rangos y Signos de Wilcoxon respectivamente, de espermatozoides epididimarios de alpaca, frescos y descongelados-----	28
Tabla 5. Correlación de Pearson entre motilidad e integridad acrosomal de espermatozoides viables, presentada por espermatozoides epididimarios de alpaca. ---	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de espermatozoides obtenidas con el analizador de imágenes del citómetro de flujo.....	14
Figura 2. Programa #7 de congelamiento automático Cryobath (Cryologic).	19
Figura 3. Histogramas para determinar la población con integridad acrosomal de espermatozoides viables.	22
Figura 4. Histogramas de los controles para los fluorocromos PI y FITC-PSA.	24
Figura 5. Esquema de evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides vivos según su etapa de procesamiento.....	25
Figura 6. Espermatozoides epididimarios de alpaca evaluados mediante el sistema analizador de imagen del citómetro de flujo.	29
Figura 7. Correlación entre el porcentaje de Integridad acrosomal de los espermatozoides viables y la motilidad, en espermatozoides epididimarios de alpaca.	30

I. INTRODUCCIÓN

La producción de camélidos sudamericanos (CSA) como recurso económico se constituye como uno de los más importantes en las regiones altoandinas. Existen, dos especies domésticas: la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*), y dos especies silvestres: la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*). La crianza de alpacas tiene como objetivo la obtención de dos productos principales: la fibra y su carne; aunque la producción de fibra de alpaca es la de mayor importancia e interés en el mercado textil internacional, convirtiéndose en un producto importante para la economía nacional por la exportación (De Los Rios, 2006). Las limitaciones tecnológicas de los productores alpaqueros, como la escasez de luz, y las especiales características reproductivas que presentan estos animales conllevan a un interés científico en ayudar en este punto, donde con la ayuda de biotecnologías reproductivas podríamos seleccionar y obtener animales con características productivas deseadas, las cuales conlleven a mejorar la calidad y rentabilidad del comercio en esta especie.

El uso de biotecnologías reproductivas es eficaz y bastante conocida en otras especies en producción como en el ganado vacuno, lográndose obtener animales genéticamente superiores y reduciendo el tiempo generacional. Sin embargo, las especiales características fisiológicas y reproductivas en las alpacas, hasta el momento no han permitido su implementación y utilidad deseada en la especie (Fernández-Baca, 1993). Es por eso que, para la mejora en la producción de esta especie, es necesaria la amplia distribución de material genético de alta calidad hacia distintas áreas geográficas donde se vean beneficiados por la obtención de nuevas generaciones de animales genéticamente superiores.

En alpacas existe escasa información sobre técnicas de inseminación artificial (IA) con semen congelado (Bravo *et al.*, 1996); esto se podría asociar al escaso desarrollo de metodologías para el uso de criopreservación de semen en CSA. Es necesaria la reducción o total interrupción del metabolismo celular de los espermatozoides para que de esta manera las estructuras espermáticas y la capacidad fertilizante se mantengan. Para tal fin, los dilutores y crioprotectores son utilizados en la criopreservación de

espermatozoides. El proceso de criopreservación somete a los espermatozoides a estrés, los cuales pueden conducir a daños letales o subletales en la célula espermática, los cuales comprometerían directamente a su capacidad fecundante (Silva *et al.* 2003).

En este sentido, es necesario realizar la evaluación de distintos parámetros seminales básicos así como parámetros de la función espermática, lo cual nos garantice que es de calidad suficiente y tenga un porcentaje de éxito alto para los fines reproductivos, es decir la fecundación. Dentro de los parámetros espermáticos se tiene al volumen, pH, motilidad, concentración, morfología, etc. En los últimos años, muchos estudios recalcan la importancia de la evaluación de los parámetros de viabilidad e integridad acrosomal. Morton *et al.* (2007) reporta una disminución de alrededor de 7% de integridad acrosomal post congelamiento en espermatozoides epididimarios de alpaca. Santiani *et al.* (2016), reporta una disminución de alrededor 16% de espermatozoides viables con integridad acrosomal post descongelamiento. Sin embargo no se ha determinado si los espermatozoides viables con integridad acrosomal disminuyen por que el proceso de congelamiento induce a la reacción acrosomal, a muerte o a una combinación de ambos.

El acrosoma, es una organela presente en la zona apical de la cabeza del espermatozoide que juega un papel fundamental en la fecundación. Las muestras seminales que presentan un gran porcentaje de espermatozoides con daño acrosomal tienen generalmente una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000). La reacción de la membrana acrosomal en el momento de la fecundación es un requisito absoluto, puesto que, la reacción acrosomal en el espermatozoide sincronizada con la fase de penetración de la zona pelúcida en el ovocito, logra la recombinación genética de ambos gametos y la formación del embrión (Januskauskas *et al.*, 2000). Así mismo, Fraser (1994) demostró con muestras seminales de ratón que sólo aquellos con acrosoma intacto pueden unirse a la membrana pelúcida. Por ello la capacidad fecundante de las muestras espermáticas se evalúan a través de integridad acrosomal y viabilidad.

En las últimas décadas, la técnica de citometría de flujo ha ofrecido una mayor precisión al evaluar la calidad espermática (Hallap *et al.*, 2005). Utilizando la citometría, se ha reportado la evaluación de viabilidad e integridad acrosomal como parámetro en

diversas especies dentro de las que se ha incluido espermatozoides frescos de alpacas (Cheuquemán *et al.*, 2013; Santiani *et al.*, 2016 y Ugarelli *et al.*, 2017).

Por lo tanto el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal de los espermatozoides viables de alpaca.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1- Inseminación artificial en alpacas

La inseminación artificial (IA) es utilizada en diversas especies como una herramienta reproductiva que permite utilizar de manera extensiva y óptima los machos con genética superior y así mismo para preservar especies en peligro de extinción. En general, los trabajos de IA en CSA domésticos publicados son escasos y esto se debe en parte a que las metodologías no son siempre aplicables en campo para la extracción de semen y además a las pobres características cualitativas y cuantitativas que presenta el semen de estas especies (Aller, 1997).

Los diferentes protocolos de IA usados en otras especies han dado resultados variables y poco alentadores en alpacas; si bien los estudios se basan en los porcentajes de motilidad espermática, esta característica no refleja el porcentaje de tasa de preñez. Fernández-Baca y Novoa (1968) realizaron el primer reporte acerca de inseminación artificial en alpacas, para ello el semen colectado de 2 vicuñas y 4 paco-vicuñas, fue usado sin diluir, y tras la inseminación de 42 alpacas se obtuvo solamente una cría de total de hembras trabajadas. Posteriormente Leyva *et al.*, (1977) colectó, con la técnica de electroeyaculación, semen de una vicuña y 4 pacovicuñas, usándolo también sin diluir; con el que inseminó 83 alpacas y 11 llamas. El 48% de las hembras se indujeron a ovulación con la hormona Gonadotrófica Coriónica Humana y un 11% de las hembras se indujeron a ovulación con la cópula de machos vasectomizados (Leyva *et al.*, 1977).

Bravo *et al.*, (1996) y Pacheco (1996) independientemente en sus estudios reportan de manera similar: tasa de preñez con semen fresco 73% a la IA y así mismo, tasa de preñez con semen fresco depositado, con la técnica de laparoscopia, directamente en los cuernos uterinos 67%. Estos estudios se realizaron en laboratorios bajo cuidados y parámetros especiales, que en su mayoría no reflejan su estado en el hábitat natural, lo cual conlleva a que exista una gran diferencia en el manejo a nivel de campo y los criadores del ganado, donde la tasa de preñez disminuyó a un 51% donde se trabajó con 207 alpacas las cuales fueron inseminadas con semen fresco diluido y con la ayuda de un análogo de GnRH o LH, se indujo a ovulación, para que 24 horas después, aproximadamente, se inseminaran (Apaza *et al.*, 2001).

La IA con semen criopreservado ha resultado una de las más importantes tecnologías que ha contribuido de manera sustancial a que los animales domésticos sean genéticamente mejores, sobre todo cuando el semen criopreservado es de un macho genéticamente superior y se puede disponer de él. En alpacas, la biotecnología de IA, a pesar de sus escasos reportes, se podría considerar una alternativa para el mejoramiento genético, pero se continúa sin desarrollar un protocolo de criopreservación óptimo, por lo que actualmente solo el semen fresco, es usado en IA (Huanca y Adams, 2007), con lo cual se limita la alta difusión de genes de alta calidad en la especie.

Un protocolo de criopreservación que contemple un gran porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación y que a su vez, la mayoría de estos espermatozoides sobrevivientes, mantengan su habilidad fecundante; será considerado óptimo. Esto implica conocer y comprender que los espermatozoides, durante el proceso de criopreservación y descongelamiento, son sometidos a estrés; así las células buscan disminuir los daños causados por las agresiones fisicoquímicas medioambientales a las que son sometidos (Silva *et al.*, 2003).

A la fecha se conocen variables resultados obtenidos de los diferentes protocolos de criopreservación estudiados, sin embargo no se reportan técnicas eficientes que nos permitan mantener la calidad espermática tras la criopreservación del semen de alpaca. Posiblemente, como ha sucedido con otros animales domésticos y silvestres, no será fácil criopreservar semen de alpaca, más aun con la dificultad de encontrar un crioprotector apropiado, además de la evidente dificultad que significan las anomalías que se observan en los eyaculados de Alpaca, comparado con otras especies.

2.2- Características de espermatozoides epididimarios

Las dos fundamentales funciones de epidídimo son: maduración y almacenamiento de espermatozoides (Chenoweth, 1997; Mortimer, 1997). En la cabeza y cuerpo del epidídimo se da el desarrollo progresivo de la capacidad fecundante de los espermatozoides o maduración; y de manera exclusiva el almacenamiento de los espermatozoides con capacidad fecundante se da en la cola del epidídimo donde se encuentran en un estado de simbiosis. (Robaire y Viger, 1995). Con esta consideración,

es importante señalar que la obtención de espermatozoides viables, con movilidad y capacidad fecundante del epidídimo, es factible, inclusive poco tiempo después de la castración o muerte del animal, los cuales podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en IA. Conservando así de manera óptima, genes de machos con alta calidad genética (Albers y Barrios, 2006).

La recuperación de gametos, post-orquiectomía o post-mortem en conjunto con la criopreservación de los mismos, ha resultado una herramienta sumamente importante que permite recuperar y resguardar el material genético e incluso crear bancos de reserva, que de otra manera se hubieran perdido en su totalidad. Además de proporcionar muestras biológicas para estudios científicos. Cabe mencionar que en todas las especies de mamíferos el epidídimo cumple la mismas función de maduración y almacenamiento de los espermatozoides y por algunos días inclusive semanas se mantienen viables y con capacidad fecundante hasta la eyaculación (Comizzoli *et al.*, 2001).

Muchos métodos de recuperación de espermatozoides del epidídimo han sido reportados. El float, en el caso de las pequeñas especies, donde el epidídimo es de menor tamaño, es el método más usado; en este método se corta la cola del epidídimo y los espermatozoides migran al exterior a través del medio gelatinoso, donde es colocada la cola del epidídimo y son recuperados por filtración (Yu *et al.*, 2002). Silva *et al.*, (2003) utilizó esta técnica en grandes especies. Otra técnica utilizada, es realizando varios cortes en la cola de epidídimo y realizando una ligera presión en la cola se colectan los espermatozoides por extravasación (Kaabi *et al.*, 1981).

Luego de la orquitectomía los testículos son lavados y almacenados con solución salina a una temperatura promedio de 4 °C, dentro un contenedor hermético. James *et al.* (2002) demostró que los espermatozoides epididimarios conservados a 4 °C son viables hasta por 96 horas post orquitectomia o post mortem del macho.

Es decir que ante la muerte repentina o una inevitable castración de un macho con gran valor genético, este tipo de biotecnología permite la recuperación y criopreservación de los espermatozoides epididimarios, de tal manera que se resguarda el material genético del macho. Además, el conservar los testículos con solución fisiológica y a una

temperatura de 4 °C mantiene viable el material genético en el epidídimo por 24 a 48 horas, para la posterior recuperación y criopreservación espermática en el laboratorio. (James *et al.*, 2002).

2.3-Criopreservación del semen

2.3.1.- Proceso de congelamiento del semen

La velocidad de reducción de la temperatura o curva de congelamiento, en la técnica de criopreservación, se debe tomar en cuenta como uno de los puntos más importantes. La curva de congelamiento y los diferentes cambios de temperatura utilizados durante el proceso de criopreservación de las muestras espermáticas, están directamente relacionados con los daños celulares, dado que los espermatozoides sufren deshidratación y la formación de cristales de hielo intracelulares, durante este proceso (Moore *et al.*, 2006).

Para la congelación de semen existen 2 métodos principales: el convencional y el automatizado. En el método convencional o también llamado manual; paso uno, periodo de enfriamiento, las pajillas previamente colocadas en una gradilla de metal son refrigeradas a 4 °C por 4 horas; paso dos, la gradilla de metal con las pajillas, se coloca 6 cm por encima del nitrógeno líquido contenido en una caja de poliestireno por un periodo de 20 minutos; paso 3, finalmente, las pajillas son inmersas en nitrógeno líquido y almacenadas en un termo de nitrógeno. En el método automatizado un equipo congelador de semen automático realiza de manera cronometrada las fases de refrigeración y congelación de las muestras para luego ser también almacenadas en un termo de nitrógeno líquido. Estos equipos tienen un protocolo estándar que se maneja según las recomendaciones del fabricante. Esto permite que las variaciones de temperatura sean estandarizadas en todas las muestras. (Vasconcelos-Filho, 2010).

2.4.- Daños en el proceso de criopreservación

2.4.1.- Shock térmico durante el proceso de criopreservación

El término con el que se describe el estrés sufrido por los espermatozoides en respuesta al descenso de temperatura durante el proceso de criopreservación, es shock

térmico. El shock térmico y el daño espermático causado por este, es el resultado del descenso de temperaturas y la velocidad en que esta ocurre (Morel, 1999). El estrés producido por la criopreservación aumenta cuando la velocidad de congelación es o muy rápida o muy lenta (Stornelli *et al.*, 2005).

Es conocido que por debajo de -20°C los cambios biofísicos se hacen presentes en los espermatozoides, entre los 0°C y los -20°C se observan daños mayormente en la membrana plasmática lo que implica el aumento de su permeabilidad, incluso la salida de iones y moléculas. Incluso hasta los -60°C , la descompensación iónica y deshidratación por la que pasan los espermatozoides, causan un shock térmico bastante grave. Esto se confirma al observar con el microscopio espermatozoides con la cola doblada, con disminución o pérdida total de la motilidad por la eminente pérdida de energía, una imagen clásica es ver a través del microscopio espermatozoides dando vueltas en círculos, como consecuencia de lo antes ya anunciado (Palacios, 2005).

2.4.2.- Daños físicos y químicos a los espermatozoides

Los daños físico-químicos durante la criopreservación son los principales y más graves; en general, al deshidratarse, perder la permeabilidad de sus membranas y la formación de cristales de hielo en el espermatozoide, este pasa por un proceso conocido como estrés osmótico (Palacios, 2005).

La formación de hielo se dará intracelular y extracelularmente, en un espermatozoide sin protección sometido a temperaturas bajo cero. El daño y destrucción de la célula es consecuencia del crecimiento del hielo y cristales intracelulares. El hielo en crecimiento va arando las membranas, mientras que al mismo tiempo se van acumulando sales y solutos dentro de la célula, daño osmótico, como consecuencia de fijarse las moléculas de agua a los núcleos de hielo; estos son los principales mecanismos por los que se da el daño (Ortega, 2008).

Los cristales de agua pura inician su formación al bajar a -5°C la temperatura, los solutos que se encuentran dentro de la célula quedan separados por la formación de los cristales de agua pura o cristalización. Debido a que la cristalización se da de manera

paulatina, las porciones de agua no cristalizadas o agua pre-congelada contienen grandes concentraciones de sales. (Palacios, 2005). Como consecuencia de esto se observa un aumento en la presión osmótica, y al formarse los cristales de agua de manera más lenta dentro del espermatozoide (citoplasma), en comparación del agua extracelular (Morel, 1999), el gradiente osmótico lleva a la salida de agua fuera de la célula, a través de la membrana plasmática. Finalmente el espermatozoide se deshidrata y pierde funcionalidad.

La temperatura, la velocidad con la que desciende la temperatura y el volumen de agua pre-congelada regulan directamente el fenómeno de cristalización del agua intracelular, que daña las membranas intracelulares y así mismo la presión osmótica del agua pre-congelada. (Stornelli *et al.*, 2005). Entonces durante la criopreservación los espermatozoides son sometidos a condiciones hipertónicas, que originan una pérdida osmótica de agua que será regulada principalmente con la curva de congelación (tiempo y temperatura).

2.4.3.- Daños a las membranas celulares

Los cambios de fase en la membrana celular que alteran los receptores de membrana y proteínas como consecuencia del congelamiento, interfieren en su fundamental capacidad de reconocimiento del ovocito, y el transporte de agua e iones a través de la membrana (Ortega, 2008).

A través del transporte activo, los iones Na^+ y Ca^{++} que entran a las células espermáticas son retirados, debido a la alteración sufrida por los espermatozoides al congelarse. A 5°C la permeabilidad al Ca^{++} crece de manera significativa, de tal forma que supera la capacidad de eliminación de las bombas de Ca^{++} . Es por ello que encuentra Ca^{++} acumulado a niveles tóxicos dentro de los espermatozoide (Palma, 2001). Este daño se manifiesta principalmente de dos manera; con la disminución de la motilidad, y cambios en la morfología del acrosoma (Morel, 1999). Se postula que el daño acrosomal causado por la acumulación del Ca^{++} es el más grave debido a la pérdida de la capacidad fecundante del espermatozoide en comparación con la disminución de motilidad (Palma, 2001).

2.4.4.- Daño oxidativo

Los hidratos de carbono, lípidos y proteínas a través de procesos oxidativos, son aprovechados por el espermatozoide, para la obtención de energía, manteniendo así su funcionalidad y viabilidad. El proceso para la obtención de ATP es el que se realiza en la mitocondria a través de la cadena respiratoria, donde también se obtienen radicales libres (ROS) (Membrillo *et al.*, 2003), que son utilizados en las funciones espermáticas.

Los ROS, moléculas químicas con un electrón libre, que los convierte en moléculas altamente reactivas; estas moléculas al tratar de estabilizarse sustraen electrones y pueden causar daño a diversas biomoléculas. El estrés oxidativo al que se somete a los espermatozoides durante la criopreservación, tiene como consecuencia un posible daño del ADN (Membrillo *et al.*, 2003).

Al aumentar los ROS aumenta la probabilidad de daño a los espermatozoides por estrés oxidativo, puesto que, los lípidos en la membrana espermática sufren peroxidación, alteración de su fluidez y cambios en su permeabilidad, lo que finalmente lleva a la muerte del espermatozoide. La alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas espermáticas, vuelve a los espermatozoides altamente susceptibles a los problemas de oxidación o peroxidación, anulando la probabilidad de fecundación (Membrillo *et al.*, 2003). Además, los ROS formados en los espermatozoides dañados, causan un gran impacto en las células viables al rededor, ya que representarían un daño acumulativo para los espermatozoides almacenados (Membrillo *et al.*, 2003).

Aunque la función de los crioprotectores es en parte proteger a los espermatozoides con sistemas de defensa antioxidante, en situaciones en las que los ROS se producen en exceso, los crioprotectores llegan a ser superados y el estrés oxidativo es irreversible (Membrillo *et al.*, 2003).

Por otra parte, se sabe que a pesar de que los ROS tienen un efecto negativo en la funcionalidad espermática cuando hay acumulación en exceso; La capacitación

espermática, reacción acrosomal, hiperactivación y la fusión espermatozoide-ovocito se dan bajo la producción controlada de ROS (Morel, 1999).

2.5.- Criopreservación de espermatozoides de alpaca

A través de los años se sigue intentado encontrar un protocolo de criopreservación óptimo para el semen de alpaca, hallándose los diferentes resultados. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en algunas investigaciones realizadas en criopreservación de espermatozoides de CSA.

Tabla 1. Investigaciones realizadas en criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos en los últimos años, métodos utilizados y los diferentes resultados obtenidos.

AUTOR / AÑO	MÉTODO DE OBTENCIÓN Y/O TRATAMIENTO	RESULTADOS	
McEvoy <i>et al.</i> , 1992	Electro eyaculación / Tris, yema de huevo y glicerol	10% motilidad post descongelamiento	
Bravo <i>et al.</i> , 1996	Colagenasa, citrato de sodio, yema de huevo y glicerol (7%)	30 – 40 % motilidad post descongelamiento	
Santiani <i>et al.</i> , 2005	Crioprotector etilenglicol	20% motilidad post descongelamiento	
Morton <i>et al.</i> , 2007	Dilutor a base de lactosa	Motilidad	Integridad
		18%	acrosomal
Morton <i>et al.</i> , 2010	Dilutor de solución de lactosa, 20% yema de huevo y 3 % glicerol	Porcentaje de motilidad	Integridad acrosomal
		20.5 %	81%

Banda <i>et al.</i> , 2010	Dilutor a base de leche descremada	Motilidad 17%	Integridad acrosomal 27%
Santiani <i>et al.</i> , 2014	Leche descremada, yema de huevo, fructuosa y antioxidante, hidroxí tetrametilpiperidina	Motilidad 22%	Viabilidad e integridad acrosomal 32%
Ccalta <i>et al.</i> , 2015	Ciclodextrinas saturadas de colesterol, papaína inhibidor de papaína	Motilidad 8%	Integridad acrosomal 45%

A pesar de los intentos por encontrar un protocolo de criopreservación óptimo, la tabla 1 muestra que los resultados obtenidos no han sido favorables. Lo cual confirma la necesidad de conocer más a fondo las características y necesidades de los espermatozoides de CSA, para mantener.

2.6.- Evaluación de viabilidad espermática y membrana acrosomal por citometría de flujo.

2.6.1.- Importancia de la viabilidad y la integridad acrosomal en espermatozoides.

Muchos estudios han determinado el porcentaje de viabilidad e integridad acrosomal post- descongelamiento del semen de alpaca, en algunos la evaluación de estos parámetros se realizó de manera independiente. Discriminándose de esta manera la importancia de estos dos parámetros en conjunto para la fecundación del ovocito. En el 2005, Santiani *et.al.* y en el 2010 Banda *et.al.* realizaron la evaluación de ambos parámetros en conjunto con la técnica de doble tinción con azul de tripán, evaluado a través de microscopía óptica, pero este método resulta ser poco preciso y bastante subjetivo, ya que varía según el criterio del evaluador.

En la zona apical de la cabeza del espermatozoide se encuentra una organela membranosa, el acrosoma. Esta organela con la acción de las enzimas hialuronidasa y acrosina llevan a cabo el proceso de liberación del ADN espermático al medio extracelular, que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática (Ramalho-Santos *et al.*, 2002), llevando a cabo la fecundación del ovocito. La liberación del ADN contenido en el acrosoma, se realiza a través de los mecanismos de señalización activado ante la unión del espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito (Harrison, 1998) y mediado por la hormona progesterona de las hembras (Patrat *et al.*, 2000), esto a la vez es regulado intracelularmente con el aumento de calcio.

Se utilizan diferentes inductores in vitro para la reacción acrosomal (Patrat *et al.*, 2000) uno de los más conocidos es el Calcio ionóforo (Carretero *et al.*, 2015). Este regula la comunicación molecular del espermatozoide, su medio ambiente y el ovocito a través del flujo de iones de Ca^{+2} y K^{+} , controlando la reacción acrosomal para la fecundación (Cardona *et al.*, 2006).

2.6.2- Marcadores de daño acrosomal

La integridad acrosomal ha sido evaluada en el tiempo a través de diferentes técnicas, con ayuda de la microscopía de campo claro y de fluorescencia y recientemente con citometría de flujo. Utilizando azul tripán y giemsa en la técnica de doble tinción con microscopía de campo claro, Santiani *et al.* (2005) y Banda *et al.* (2010) determinaron el porcentaje de integridad acrosomal y viabilidad espermática en espermatozoides de alpaca. Así mismo, en microscopía de fluorescencia se usaron las lectinas PSA y PNA conjugadas a FITC, por su alta afinidad con el acrosoma, donde FITC-PNA es atraído por los terminales de β -galactosa ubicados dentro de la membrana acrosomal externa (Silva *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2012), mientras que FITC-PSA es atraído por las glucoproteínas ubicadas en la matriz acrosomal (Silva *et al.*, 2006; Celeghini *et al.*, 2010). Una membrana acrosomal dañada, permite el ingreso y la unión de las lectinas a su respectiva área de unión, siendo reflejadas como fluorescencia de color verde. Una reciente investigación, Ugarelli *et al.* (2015), determinó las cantidades exactas con las que las muestras deben ser incubadas, para la utilización de las lectinas FITC-PSA y FITC-PNA, y su efectiva observación del daño acrosomal. Ambas lectinas fueron empleadas en

la evaluación de integridad acrosomal de espermatozoides de humano (Risopatron *et al.*, 2001), porcino (Siciliano *et al.*, 2008), ovino (2Celeghini *et al.*, 2010) y conejo, ovino y equino (Hernández *et al.*, 2012).

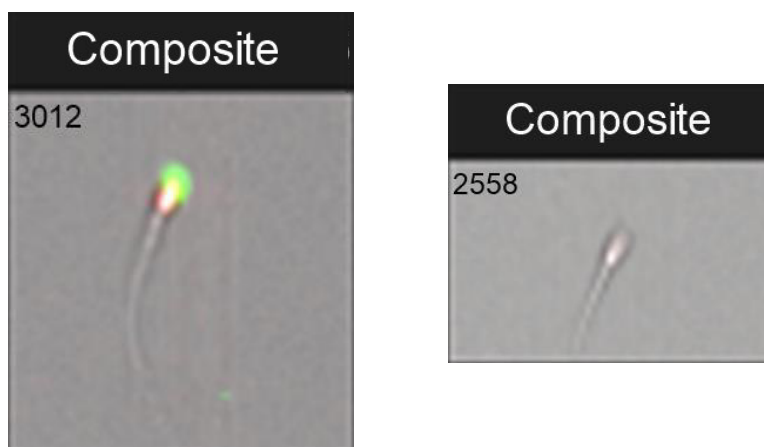


Figura 1. Imágenes de espermatozoides obtenidas con el analizador de imágenes del citómetro de flujo. . Imagen 3012, daño acrosomal de espermatozoide muerto. Imagen 2558, integridad acrosomal de espermatozoide viable.

*composite: composición de los CH-1, CH-2, CH-5 en la imagen.

2.6.3.- Citometría de flujo para análisis seminal.

La citometría de flujo es considerada una metodología analítica que realiza una medición rápida y eficaz de células o partículas que se encuentren suspendidas en líquido, permitiendo evaluar sus características físicas y químicas de manera independiente, ya que producen una señal de forma individual al interferir con la fuente de luz (Barrera *et al.*, 2004).

La medición de varios parámetros celulares, como tamaño, complejidad, forma y además los componentes de cada célula o sus funciones marcadas por fluorocromos específicos es de las más importantes cualidades analíticas del citómetro de flujo. (Barrera *et al.*, 2004).

La citometría de flujo es actualmente el método cuantitativo más rápido y objetivo para el análisis de células y las partes que la conforman, tales como: núcleos, cromosomas, acrosomas u otras partículas en suspensión. El principio de esta tecnología consiste en la alineación de las partículas suspendidas y la evaluación independiente de cada una de ellas a través de un haz luminoso; con ellos se produce dos tipos fundamentales de información; una analizada por la dispersión de la luz producida (forma, tamaño y superficies) y la fluorescencia que se observa en las células incubadas con fluorocromos y excitados con un láser. Las señales luminosas se detectan y son transformados a impulsos eléctricos amplificados que se presentan como señales digitales, la cuales se procesan en la computadora y finalmente son interpretadas (Pérez, 2006).

La citometría como ya hemos mencionado permite una evaluación rápida y objetiva, ya que esta no depende del observador, sino del software analizador del citómetro, que permite así evaluar un gran número de espermatozoides en corto tiempo, generalmente en un rango mayor a 5000 espermatozoides, que en comparación con los 100 a 200 espermatozoides evaluados generalmente en los análisis con microscopía óptica, nos dan un alto nivel de fiabilidad de la prueba, puesto que el conteo es automatizado, objetivo y rápido del flujo celular a través de la detección de intensidad de fluorescencia (Gillan *et al.*, 2005), lo cual lo vuelve ideal para los análisis de muestras espermáticas de cualquier especie.

2.6.4.- Citometría de flujo y evaluación de viabilidad e integridad acrosomal

La evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal con citometría de flujo se reportó en alpacas por Cheuquemán *et al.*, (2013) utilizando FITC-PSA/PI y en llamas Carretero *et al.*, (2015), utilizando FITC-PNA/PI. Sin embargo, recientemente, el uso de un sistema analizador de imágenes en conjunto con el citómetro de flujo, cuestionó los resultados que se obtuvieron con el uso de la citometría tradicional. Ugarelli *et al.* (2015) encontró que el FITC-PSA a una concentración de 1 $\mu\text{L/mL}$ permite que a través del citómetro de flujo se pueda observar de manera clara el acrosoma. Así mismo Ugarelli *et al.* (2017) obtuvo un 59% ($p>0.15$) de espermatozoides viables y con integridad en

muestras frescas de espermatozoides de alpaca, utilizando las concentraciones adecuadas del fluorocromo FITC-PSA.

El objetivo del presente estudio fue evaluar mediante la citometría de flujo el efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal de los espermatozoides viables de alpaca, para determinar una disminución significativa de los valores porcentuales de la misma.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de estudio

Las muestras se obtuvieron en el Camal Municipal del Distrito de Ninacaca, Pasco, región de Pasco, para luego ser procesadas en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el año 2018.

3.2. Tamaño muestral

El tamaño muestral se calculó utilizando la siguiente formula.

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

En donde:

- **n:** Muestras necesarias.
- **Z α :** Valor de Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una significancia de 0.05 y un test unilateral, el Z α es 1.645).
- **Z β :** Valor de Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una Potencia de 0.90, el valor de Z es 1.282).
- **S 2 :** Varianza de la variable. (En donde de acuerdo a Santiani *et al.*, (2016) el D.S. del porcentaje de espermatozoides viables con integridad acrosomal es 8%).
- **d:** Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar. Se proyecta una reducción de la integridad acrosomal en un 5%.

Calculando:

$$n = 2 \times (1.645 + 1.282)^2 \times (8)^2 / 5^2 = 43.86 \text{ testículos}$$

Se decidió trabajar con 46 testículos.

3.3. Obtención de muestras

Los 46 testículos se obtuvieron de alpacas beneficiadas. Luego del beneficio los testículos recuperados se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0.9%) posteriormente se colocaron en bolsas herméticas individuales junto con la solución fisiológica. Se almacenaron en cajas transportadoras, utilizando refrigerantes en gel y así transportarlos en una temperatura a 4°C para posteriormente trasladarlo y evaluarlo en Lima. Los testículos seleccionados midieron un mínimo de 3 cm y tuvieron un peso mínimo de 10g para ser considerarlos en el presente estudio, dado que son adecuados indicadores de la función espermática de un macho adulto.

3.3.1. Preparación del dilutor

Para la preparación del dilutor se procedió a realizar una mezcla de 19 mL de leche descremada, 1 mL de yema de huevo y 0.970 g de fructosa. A esta mezcla se le añadió 1840 µL del crioprotector dimetilacetamida (DMA) equivalente a una concentración final 1 M. Esta mezcla final se mantuvo temperada a 38 °C.

3.3.2. Recuperación de espermatozoides epididimarios

En el laboratorio se procesó con el retiro de la túnica vaginal visceral de cada testículo, luego se divulsionó para separar el epidídimo y se aisló la cola del epidídimo mediante un corte con tijera Mayo recta y pinza de Adson, se retiró todo el tejido conectivo visible con el mismo instrumental y con el bisel no cortante de una hoja de bisturí se corrió el contenido de los vasos sanguíneos para evitar la contaminación de la muestra. Antes de aislar la cola del epidídimo, se realizó un lavado en PBS y luego se colocó la cola del epidídimo en una placa Petri temperada a 38 °C y se le agregó 1mL de dilutor en base a leche descremada para proceder a la liberación, mediante cortes seriados; finalmente se colectó la suspensión en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo temperado a 38 °C.

3.3.3. Evaluación de calidad seminal (motilidad y concentración)

Para la evaluación de la motilidad se retiró 10 μ L de la muestra en suspensión de espermatozoides recuperados y se colocaron sobre una lámina porta objeto temperada a 38 °C, se cubrió con una lámina cubre objeto y se observó en el microscopio con un objetivo 40X. Para evaluar la concentración de la suspensión de espermatozoides recuperados de la muestra se diluyó en una proporción 1:20 con agua, se recuperó 10 μ L de la dilución y se leyó en la cámara de Neubauer a 400X. Solo aquellas muestras con motilidad $\geq 30\%$ y concentración $\geq 50 \times 10^6$ espermatozoides por mL fueron seleccionadas para este estudio.

3.3.4. Criopreservación

Para el proceso de criopreservación se utilizó nitrógeno líquido dentro de un sistema de congelamiento automático Cryobath (Cryologic). Las muestras que se procesaron a criopreservación se envasaron en pajillas para posteriormente someterlas en el Cryobath. Se utilizó el programa # 7, en el cual se inició a una temperatura de 18 °C disminuyendo luego hasta 5 °C dentro de un periodo de 90 minutos, para luego mantenerse en esas condiciones por 30 minutos. Posterior a este periodo la temperatura descendió hasta congelarse. Una vez congeladas las pajillas se retiraron y se colocaron inmediatamente en el nitrógeno líquido y se mantuvo ahí hasta el día de su evaluación.

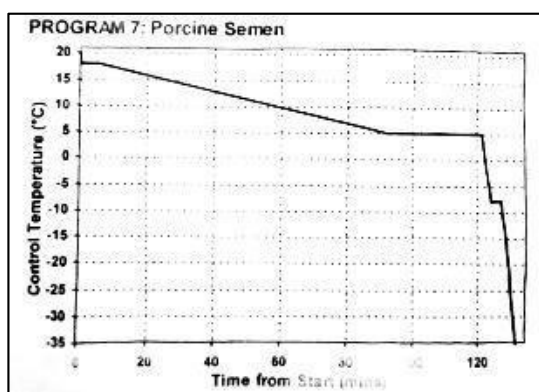


Figura 2. Programa #7 de congelamiento automático Cryobath (Cryologic).

3.3.5. Descongelamiento

Las pajillas serán descongelaron en baño maría a 37 °C durante un minuto, luego se secaron y el contenido de cada pajilla se colocó en un tubo de 1.5 mL para su evaluación.

3.3.6. Evaluación de la motilidad post descongelamiento

Luego del descongelamiento se tomó 10 µL de cada muestra y se colocó en una lámina porta objeto temperada a 38 °C, se cubrió con una lámina cubre objeto y se observó en el microscopio con un objetivo 40X para la evaluación de la motilidad.

3.3.7. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides viables

Esta evaluación se realizó utilizando el fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína conjugada a Pisum sativum (FITC-PSA), L0770, Sigma-Aldrich, como indicador de daño acrosomal y el fluorocromo Ioduro de propidio (PI), L7011, Molecular-probes, como indicador de espermatozoides no viables. La evaluación se realizó antes y después del proceso de criopreservación, para tal efecto cada muestra descongelada se lavó 2 veces por centrifugación con PBS temperado a 38 °C a 600 G por 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 150 µL de PBS.

Se tomó 100 µL de muestra después del lavado y se agregó 0.5 µL de PI (1mg/ml) y 2.5µL de FITC-PSA (100 µg/ml) para obtener una concentración final de 5 µg/ml y 2.5 µg/ml respectivamente de cada solución de trabajo, y se incubó durante 10 minutos a 38 °C en oscuridad.

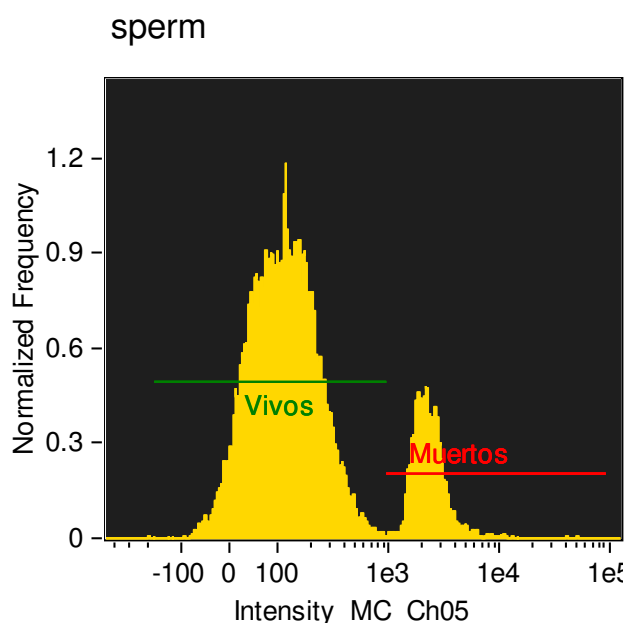
3.3.8. Citometría de flujo

Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo FlowSight (Amnis Seattle, EEUU), equipado con un sistema analizador de imágenes. El software de

adquisición usado fue INSPIRE® v. 100.3.218.0 (Amnis, Seattle, EEUU) y el software para analizar los datos fue IDEAS® v. 6.2 (Amnis, Seattle, EEUU). Se adquirieron diez mil eventos compatibles con espermatozoides por cada muestra. Para la excitación de PI y del FITC-PSA se utilizó un láser de longitud de onda de 488 nm y con una potencia de 20mW; la emisión de la fluorescencia se leyó utilizando el canal de detección Ch-5 (642 a 740 nm) y Ch-2 (505 a 560 nm) respectivamente. En primer lugar se seleccionaron los espermatozoides viables, los eventos se presentaron utilizando un gráfico tipo histograma, en donde el eje “X” midió la intensidad de fluorescencia del PI (Ch-5) y el eje “Y” el número de eventos. Se consideraron espermatozoides viables, aquellos que no presentaban fluorescencia a PI. Tras la selección de los espermatozoides viables (Fig. 3A), los eventos se presentaron utilizando nuevamente un gráfico tipo histograma, en donde el eje “X” midió la intensidad de fluorescencia de FITC-PSA (Ch-2) y el eje “Y” el número de eventos. Se consideraron espermatozoides con integridad acrosomal aquellos sin fluorescencia para FITC-PSA (Fig. 3B).

Dado que el citómetro de flujo cuenta con un sistema analizador de imágenes, se observaron fotos de espermatozoides para verificar que cumplan con los criterios de intensidad de fluorescencia mencionados.

A. Selección de espermatozoides viables



B. Selección de integridad acrosomal.

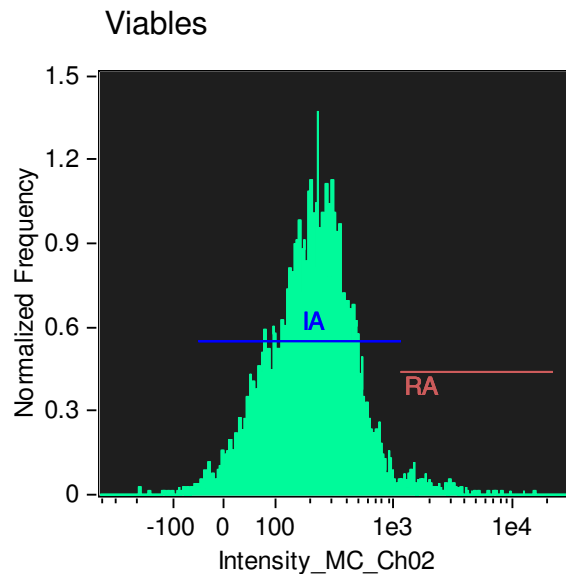


Figura 3. Histogramas para determinar la población con integridad acrosomal de los espermatozoides viables. (A) Histograma de PI (CH-5), selección de espermatozoides viables aquellos con menos intensidad de fluorescencia para PI. (B) selección de espermatozoides con integridad acrosomal sobre la población de espermatozoides viables. Espermatozoides con integridad acrosomal aquellos con menos intensidad de fluorescencia para FITC-PSA.

* (IA) Integridad acrosomal (RA) Reacción acrosomal.

3.3.9. Controles de fluorescencia

Para la corroboración de los datos se realizó los controles de autofluorescencia, control de FITC-PSA y control PI:

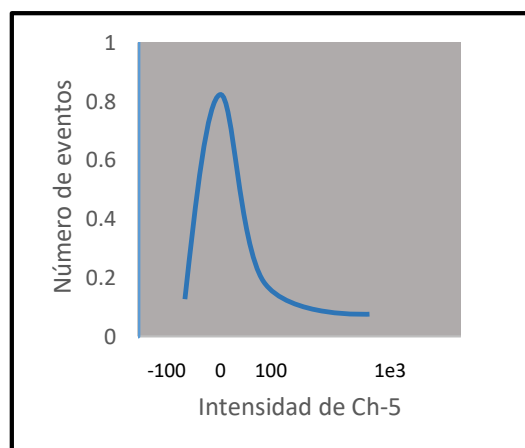
- El control de autofluorescencia en donde se analizó las muestras espermáticas a través del citómetro de flujo sin la utilización de algún fluorocromo.
- El control de PI, en el cual las muestras de espermatozoides se indujeron a muerte celular diluyendo la muestra con agua y sometiéndola a una temperatura de -5°C

por 30 minutos, y luego se evaluaron a través del citómetro de flujo utilizando el fluorocromo Ioduro de propidio

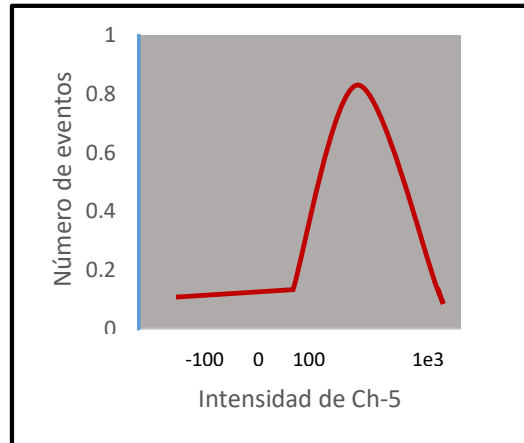
- El control de FITC-PSA, en el cual las muestras se indujeron a reacción acrosomal con Ionóforo de calcio (A23187, Sigma-Aldrich), se incubó la muestra por una hora a 38°C en una concentración de 10 µg/mL de calcio ionóforo, y luego se evaluaron a través del citómetro de flujo utilizando el fluorocromo FITC-PSA.

En la figura 4 se ejemplifican los controles realizados. Fig. 4A control de autofluorescencia de PI, se observan los espermatozoides con fluorescencia cero para CH-5, debido a la ausencia de fluorocromos en la muestra, la población se observa a la izquierda del eje x. Fig. 4B control de PI, al ser inducidos a muerte los espermatozoides incubados con PI se presentan con mayor intensidad de fluorescencia en el CH-5, la población se observa hacia la derecha del eje x. Fig. 4C control de FITC-PSA, al inducir a la reacción acrosomal los espermatozoides incubados con FITC-PSA se presentan con mayor intensidad de fluorescencia en el CH-2, la población se observa a la derecha del eje x.

A. Control de autofluorescencia



B. Control de PI



C. Control de FITC-PSA

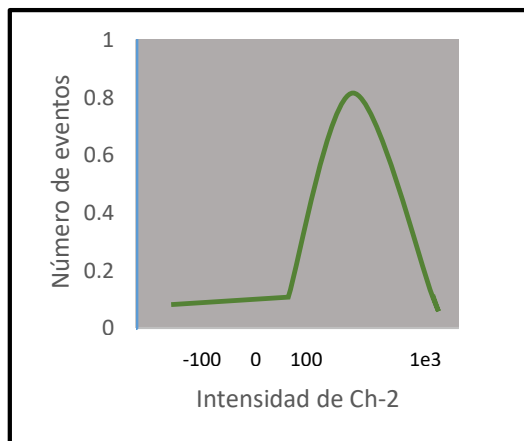
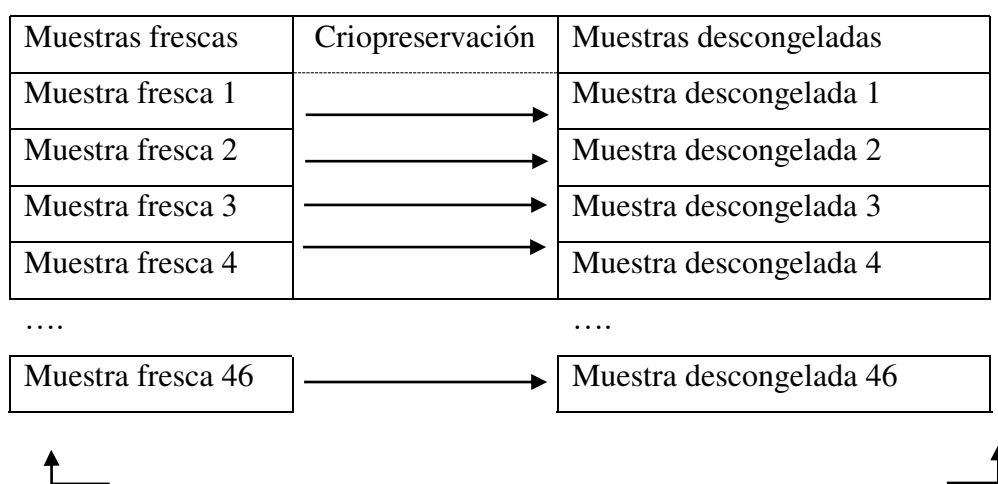


Figura 4. Histogramas de los controles para los fluorocromos PI y FITC-PSA. (A) control de autofluorescencia de PI, espermatozoides sin fluorescencia agrupados hacia la izquierda del eje x. (B) Control de fluorescencia PI, espermatozoides inducidos a muerte muestran altos niveles de fluorescencia, agrupados hacia la derecha del eje x. (C) control de fluorescencia de FITC-PSA, espermatozoides inducidos a reacción acrosomal muestran altos niveles de fluorescencia, agrupados hacia a derecha del eje x.

3.3.10. Diseño experimental y observacional

Se realizó un diseño de muestras pareadas, en donde se evaluó las 46 muestras obtenidas, divididas en 2 etapas: evaluación de muestras en fresco y evaluación post descongelamiento.



Momentos de evaluación de integridad acrosomal de los
espermatozoides viables

*Cada muestra consta de dos alicuotas para evaluación: Muestra fresca y muestra descongelada

Figura 5. Esquema de evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides viables según su etapa de procesamiento.

3.3.11. Análisis de la información

Los parámetros de integridad acrosomal en espermatozoides viables y de motilidad fueron evaluados mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para determinar si siguen una distribución normal. La prueba de rangos y signos de Wilcoxon, fué utilizada para determinar el efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de los espermatozoides viables, mientras que la prueba de T-student pareado fue utilizada para evaluar el efecto de la criopreservación en la motilidad. El criterio de selección de

las pruebas estadísticas según la distribución normal de cada parámetro, es presentado en la tabla 2 a continuación.

Además se correlacionó integridad acrosomal de los espermatozoides viables con motilidad utilizando el coeficiente de correlación de Sperman. Se analizaron en simultaneo los datos obtenidos de las 46 muestras frescas, más los datos de las 46 muestras descongeladas.

Tabla 2. Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov para integridad acrosomal de espermatozoides viables y motilidad. Pruebas estadísticas para análisis de los parámetros de Integridad acrosomal en espermatozoides viables y motilidad.

Parámetro	Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov	Prueba estadística
Integridad acrosomal en espermatozoides viables	No normal	Prueba de rangos y signos de Wilcoxon
Motilidad	Normal	T-student pareado

IV. RESULTADOS

Las muestras frescas y descongeladas de los espermatozoides epididimarios de alpacas se analizaron a través del citómetro de flujo utilizando los fluorocromos PI y FITC-PSA. Los datos estadísticos de integridad acrosomal en los espermatozoides viables, se presentan en la tabla 3.

La integridad acrosomal de los espermatozoides viables de las muestras frescas obtuvieron un promedio de 98.25%, una mediana de 99.67%, una desviación estándar de 5.40%, un coeficiente de variación de 5.50% y un intervalo de confianza de 1.61%. Por otro lado la integridad acrosomal de los espermatozoides viables en las muestras descongeladas, obtuvieron un promedio de 98.75% una mediana de 99.37%, una desviación estándar de 2.17%, un coeficiente de variación de 2.20% y un intervalo de confianza de 0.65%.

Tabla 3. Espermatozoides epididimarios de alpacas, frescos y descongelados, analizados con los fluorocromos FITC-PSA y PI para evaluar integridad acrosomal de los espermatozoides viables

	Muestras frescas	Muestras descongeladas
	Integridad acrosomal de los espermatozoides viables (%)	Integridad acrosomal de los espermatozoides viables (%)
Promedio	98.25	98.75
Mediana	99.67	99.37
Desviación Estándar	5.40	2.17
Coeficiente de variación	5.50	2.20
Intervalo de confianza	1.61	0.65

En la tabla 4 se obtiene un valor de $46.63 \pm 7.68\%$ en la motilidad de las muestras de espermatozoides frescos y un valor de $23.74 \pm 6.24\%$ en la motilidad de las muestras de espermatozoides descongelados, encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ellas al analizar los valores mediante la prueba de t de Student pareado.

Referente a la integridad acrosomal de los espermatozoides viables, se obtuvo un valor de $98.25 \pm 5.40\%$ en las muestras de espermatozoides frescos y un valor de $98.75 \pm 2.17\%$ en las muestras de espermatozoides descongelados, sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre ellas al analizar los valores mediante la prueba de Rangos y signos de Wilcoxon.

Tabla 4. Evaluación de la motilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides viables mediante el estudio estadístico de t- student pareado y la prueba de Rangos y Signos de Wilcoxon respectivamente, de espermatozoides epididimarios de alpaca, frescos y descongelados

	Muestras de espermatozoides frescos	Muestras de espermatozoides descongelados
Integridad acrosomal de los espermatozoides viables (%)	98.25 ± 5.40^a	98.75 ± 2.17^a
Motilidad (%)	46.63 ± 7.68^a	23.74 ± 6.24^b

*Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

En la figura 6 se presentan fotos de espermatozoides analizados mediante citometría de flujo. El espermatozoide que se observa en la fig. 6A pertenece a la población integridad acrosomal, observada mediante el sistema analizador de imágenes

del citómetro de flujo utilizando el canal Ch 1 en campo claro, se observa usencia de fluorescencia ante la exposición a los filtros para los fluorocromos FITC-PSA del Ch-2 y Ioduro de Propidio del Ch-5, ambos en campo oscuro y en conjunto los Ch-1, Ch-2 y Ch-5 (composite) en campo claro. En la fig. 6B se presenta un espermatozoide que pertenece a la población de eventos muertos con daño acrosomal, observada bajo el sistema analizador de imágenes del citómetro de flujo utilizando el Ch 1 en campo claro, se observa fluorescencia ante la exposición a los filtros para los fluorocromos FITC-PSA del Ch-2, fluorescencia verde y Ioduro de Propidio del Ch-5, fluorescencia roja; en conjunto los Ch-1, Ch-2 y Ch-5 (composite) en campo claro, se observa fluorescencia en la región acrosomal (verde) y en el núcleo (rojo).

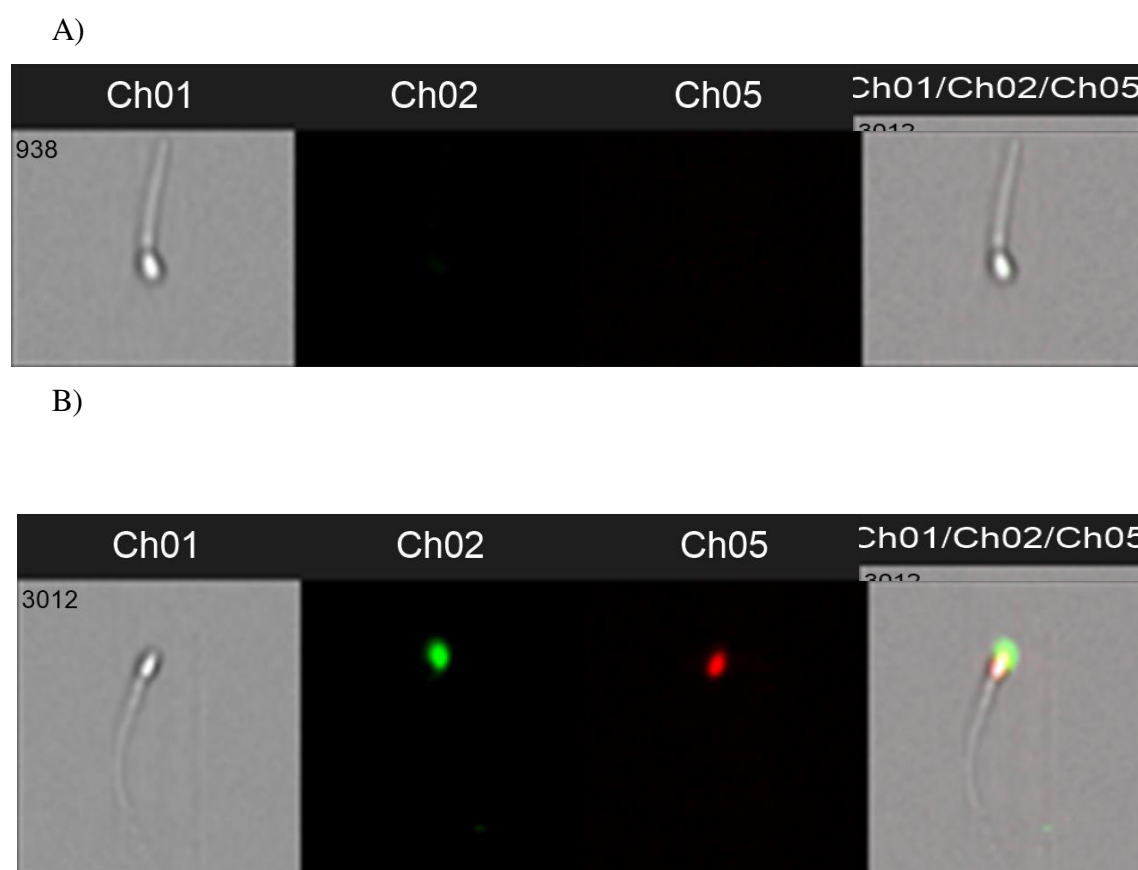


Figura 6. Espermatozoides epididimarios de alpaca evaluados mediante el sistema analizador de imagen del citómetro de flujo. (A) Integridad acrosomal de espermatozoide viable. (B) Daño acrosomal de espermatozoide muerto

En la tabla 5 se presenta el análisis de correlación de Pearson entre los valores porcentuales obtenidos entre motilidad e integridad acrosomal de espermatozoides

viables. . Se obtuvo una correlación positiva débil ($r = 0.1528$), pero no significativa ($p=0.1458$).

Tabla 5. Correlación de Pearson entre motilidad e integridad acrosomal de espermatozoides viables, presentada por espermatozoides epididimarios de alpaca.

Parámetros	Correlación de Pearson		Pares (n)
	r	p	
Espermáticos			
Motilidad vs Integridad acrosomal de espermatozoides viables	0.1528	$p<0.1458$	92

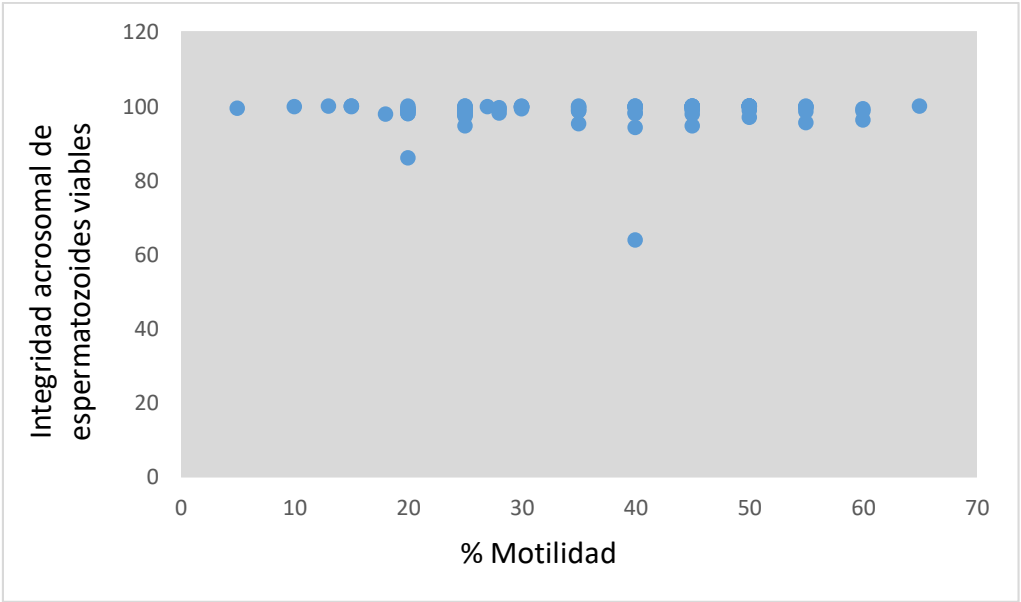


Figura 7. Correlación entre el porcentaje de Integridad acrosomal de los espermatozoides viables y la motilidad, en espermatozoides epididimarios de alpaca.

V. DISCUSIÓN

Este trabajo es el primer reporte que confirma que la integridad acrosomal de los espermatozoides viables no varía significativamente durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas analizados mediante el citómetro de flujo, utilizando los fluorocromos Ioduro de propidio y FITC-PSA. La membrana acrosomal delimita el acrosoma, protegiendo las enzimas hidrolíticas que lo conforman. Es importante que los espermatozoides viables mantenga intacta la membrana acrosomal y con ello su capacidad fecundante, ya que al entrar en contacto con el ovocito, la reacción acrosomal a través de las enzimas contenidas en él, permitan que se dé la fecundación.

De lo anterior, se espera encontrar valores elevados de integridad acrosomal en los espermatozoides viables en muestras espermáticas frescas de alpaca. Ugarelli *et al.* (2017) reportó alrededor de 61% espermatozoides viables con integridad acrosomal, sobre el total de espermatozoides en la muestra; utilizando para su evaluación el fluorocromo FITC-PSA. En el mismo artículo Ugarelli *et al.* (2017), utilizando el fluorocromo FITC-PNA, reporta alrededor 59% de espermatozoides viables con integridad acrosomal, sobre el total de espermatozoides en la muestra. Sobre ello cabe resaltar que Ugarelli *et al.* (2017) presenta los resultados obtenidos sobre el total de espermatozoides vivos y muertos de las muestras y en nuestro caso, para los fines de nuestro estudio, presentamos los valores de integridad acrosomal en la población de espermatozoides viables. De esta manera se podría inferir que los valores obtenidos en ambos estudios son similares.

Por otro lado Santiani *et al.* (2013) evaluó muestras de eyaculado de alpaca utilizando la técnica de doble tinción con azul de tripán y giemsa obteniendo un valor alrededor de 46% para viabilidad con integridad acrosomal en muestras frescas, siendo este un valor por debajo de lo encontrado en nuestro estudio y en Ugarelli *et al.* (2017). De ello podemos decir que el método de evaluación utilizado por Santiani *et al.* (2013) es un método subjetivo, en el cual el evaluador determina si hay daño acrosomal en el espermatozoide observado o no, pudiéndose encontrar diferencias en lo determinado entre un evaluador y otro. En nuestro estudio el citómetro de flujo nos permite

estandarizar la evaluación de las muestras, y así mismo nos permite evaluar una mayor cantidad de espermatozoides por muestra obtenida. Así mismo el analizador de imágenes del citómetro de flujo nos permite confirmar la información obtenida en las muestras.

Posterior al proceso de criopreservación la calidad espermática disminuyó significativamente, disminuyendo con ello la cantidad de espermatozoides viables, sin embargo el porcentaje de integridad acrosomal dentro del grupo de espermatozoides viables se mantuvo alrededor del 98%. Ccalta *et al.* (2015), utilizando el método de tinción de Coomasie, encontró un 45% de integridad acrosomal sobre la población total de espermatozoides descongelados de alpaca. Mostrando así una disminución de 32% de la integridad acrosomal en los espermatozoides de alpaca, tras la criopreservación de las muestras. Sin embargo Ccalta *et al.* (2015) no especifica si los espermatozoides con integridad acrosomal son viables o muertos, ya que se evaluó a la integridad acrosomal como variable independiente.

Lo obtenido post descongelamiento por Santiani *et al* (2013) es alrededor de 33% de espermatozoides viables con integridad acrosomal del total de espermatozoides evaluados. Mostrando así una disminución del 13 % de espermatozoides con integridad acrosomal en muestras de alpaca, tras la criopreservación. Sin embargo, Santiani *et al* (2013) no precisa si la disminución de la población de espermatozoides viables con integridad acrosomal se ve disminuida post descongelamiento debido a que la criopreservación induce a los espermatozoides a muerte o a la reacción del acrosomal. Así mismo, tal como indicamos anteriormente, el método de evaluación de Santiani *et al.* (2013) es un método subjetivo, ya que la interpretación puede variar según cada evaluador.

Hasta el momento no se han reportado más resultados que muestren el porcentaje de integridad acrosomal en los espermatozoides viables de alpaca luego del proceso de criopreservación, sin embargo se tiene reportes de valores obtenidos en otras especies, como el trabajo de Hernández *et al.* (2012) donde se evaluó eyaculados de ovinos utilizando el fluorocromo FITC-PNA y PI, los espermatozoides descongelados presentaron alrededor de 27% de viabilidad e integridad acrosomal, observándose una disminución de 49% de espermatozoides viables con integridad acrosomal. En equinos,

Hernández *et al.*, (2012), evaluando muestras de espermatozoides epididimarios con los fluorocromos FITC-PNA y PI, obtuvo 43% de viabilidad con integridad acrosomal en las muestras descongeladas, viéndose disminuido en un 22% la población de espermatozoides viables con integridad acrosomal. Así mismo en muestras de semen de conejo, Hernández *et al.* (2012) obtuvo un 40% de espermatozoides viables con integridad acrosomal post descongelamiento, observándose una disminución de 33% post descongelación. Los porcentajes presentados en los estudios de Hernández *et al.* (2012) son expresados también sobre el total de espermatozoides evaluados, y no permiten determinar si la disminución de las poblaciones de viabilidad con integridad acrosomal es debido a la muerte de los espermatozoides o a la reacción acrosomal.

Como se viene considerando desde hace algún tiempo, la medición de la viabilidad en conjunto con la integridad acrosomal es un parámetro que indica la capacidad fecundante de la muestra espermática, por lo que es necesario conocer qué porcentaje de los espermatozoides vivos mantienen la capacidad fecundante después del proceso de criopreservación. Este estudio demuestra que la integridad acrosomal se mantiene porcentualmente dentro del grupo de espermatozoides vivos incluso después del proceso de criopreservación, sin embargo es pertinente indicar que para calcular el tamaño muestral en este estudio consideramos una diferencia mínima a detectar del 5%. Esto quiero decir que si bien, no encontramos diferencias en la integridad acrosomal antes y después del proceso de criopreservación, podría ser que si existen tales diferencias, aunque en un valor menor al 5%, las cuales de existir no tendrían relevancia fisiológica.

Con respecto a la motilidad este estudio obtuvo cerca del 47% de motilidad en las muestras frescas y después del descongelamiento cerca del 24% de motilidad, siendo esta una variación estadísticamente significativa. Resultados parecidos se obtuvieron en Valdivia *et al.* (1999) con 98% de motilidad en las muestras frescas y 20% después del congelamiento de las muestras; Santiani *et al.* (2005) reportó 72% de motilidad en muestras frescas y 20% en muestras descongeladas; Santiani *et al.* (2013) reporta en muestras frescas 53% motilidad y en muestras descongeladas 22%. En todos estos reportes, así como en el nuestro, la variación de motilidad post descongelamiento es estadísticamente significativa.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos específicos por lo que la criopreservación disminuye la calidad espermática, sin embargo en términos generales los espermatozoides son sometidos a diferentes condiciones físicas y químicas durante el proceso de congelación y descongelación, y es por estas variaciones que valores como motilidad y viabilidad disminuyen. Sin embargo este estudio demuestra que a pesar de ello dentro del grupo de espermatozoides viables, el porcentaje de integridad acrosomal se mantiene.

Por esto, al evaluarse el coeficiente de correlación lineal de Pearson se obtuvo 0.1528, entre motilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides viables; encontrándose que la relación existente entre ambas es negativa. En conclusión el porcentaje de integridad acrosomal de los espermatozoides viables, no desciende significativamente luego del proceso de criopreservación manteniendo la capacidad fecundante dentro del grupo de espermatozoides viables de la muestra espermática.

VI. CONCLUSIONES

- El porcentaje de integridad acrosomal de los espermatozoides viables en las muestras espermáticas, obtenidas de la cola del epidídimo, no se observa una disminución significativa, luego del proceso de criopreservación.
- La integridad acrosomal no mantiene relación con la motilidad.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Albers, M. y Barrios, D. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. En XIII Congreso de Producción e Industria Animal.
2. Aller, J., Ferre, L., Rebuffi, G. y Alberio, R. 1997. Recolección de semen de llama (*Lama glama*) en la Puna argentina. *Rev. Vet. Arg.* Vol. 132, 104-107.
3. Apaza, N., Sapana, R., Huanca, T. y Huanca, W. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev. Inv. Vet. Perú.* Supl. 1: 435 – 438.
4. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010. Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 21: 145-153. doi: 10.15381/rivep.v21i2.129
5. Barrera L., Drago M., Pérez J., Zamora A., Gómez F., Sainz T., Mendoza F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 17 (1): 42-55.
6. Bravo W, Flores U, Garnica J, Ordoñez C 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
7. Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. En: 13mo ICAR. Sydney, Australia.
8. Bravo, P., Skidmore, A. y Zhao, X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim. Reprod. Sci.* 62 (1): 73–93.
9. Burgel, H., Erhardt, G., Gauly, M. 2001. Cryopreservation of llama (*Lama glama*). Spermatozoa with. On egg yolk. Free extender, in Gerken M. Renieri C, (eds) progress in south American Camelids Research.
10. Bustinza, A. 2001. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje, Universidad Nacional del Altiplano. 343 p.
11. Cardona W, Olivera M, Cadavid A. 2006. Evaluación de la reacción cromosomal inducida por ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Arch Esp Urol* 59: 501-510.
12. Carretero MI, Fumuso F, Neild D, Giuliano S, Cetica P, Miragaya M. 2015. Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim Reprod Sci* 160: 1-11. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.014

13. Castelo, T., Rodríguez T., y Rodriguez, A. 2008. Considerations on Goat Semen Cryopreservation. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2(3): 67–75.
14. Ccalta R., Ordoñez C., Ampuero E., Cucho H. 2017. Efecto de la criopreservación en la morfometría del espermatozoide de alpaca. *Spermova* 7 (2): 100-105. DOI. 10.18548/aspe/0005.17
15. Celeghini E, Nascimiento J, Raphael C, Andrade A, Arruda R. 2010. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq Bras Med Vet Zootec* 62: 536-543. doi: 10.1590/S0102-09352010000300006
16. Chenoweth, P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. *Theriogenology*. Saunders, 217- 229.
17. Chen, L., Summerhayes, I., Johnson, L., Walsh, M., Bernal, S., Lampidis, T. 1982. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology*. 46: 141-155.
18. Cheuquemán, C., Merino, O., Giojalas, L., Von Baer, A., Sánchez, R., y Risopatrón, J. (2013). Assessment of Sperm Function Parameters and DNA Fragmentation in Ejaculated Alpaca Sperm (*Lama Pacos*) by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*. 48 (3): 447–453.
19. Comizzoli, P., Mermillo, P., Cognie, Y., Chai, N., Legendre, X., Mauge, R. 2001. Succesful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55: 649-659.
20. De Baulny, B., Le Vern, Y., Maisse, G. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*. 34: 141-149.
21. De Los Ríos, E. 2006. Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área alto-andina de Bolivia, Ecuador y Perú. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO). Disponible en: https://www.unido.org/file-storage/download/?file_id=58563
22. De Mercado E, Rodriguez A, Gómez E, Sanz E. 2010. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 118 (1): 54-61.
23. Downing, T, Garner, D., Ericsson, S., Redelman, D. 1991 - Metabolic toxicity of fluorescent stains on thawed cryopreserved bovine sperm cells. *Journal Histo. Cytochemistry* 39: 485-489.
24. Ericsson, S., Garner, D., Thomas, C., Downing, T., Marshall, C. 1993. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoa function, classical

- semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 39: 1009 - 1024
25. Evenson, D., Darzynkiewicz, Z., Melame D. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal Histo. Cytochemistry*. 30: 279 - 280.
 26. FAO. Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. 2005.
 27. Fernández-Baca, S. y Novoa, C. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev. Fac. Med. Vet.* 22: 9-18.
 28. Fernández-Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 307-323.
 29. Fraser LR 1994. Sperm functional changes from ejaculation to fertilization. *Ares-Serono Symposia* 8: 46-66.
 30. Garde, J., Aguado, M., Perez, S., Garrido, D., Perez-Guzman, M., Montoro, V. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem ram. *Theriogenology* 41: 2003.
 31. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445-457. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.- 09.024
 32. Graham, J., Kunze, E., Hammerstedt, R. 1990. Analysis of sperm viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43: 55-64.
 33. Graham, J. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 239-247.
 34. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by Mitotracker Deep Red 633. *Theriogenology* 63: 2311-2322.
 35. Harrison R. 1998. Sperm evaluation: what should be testing? In: 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Tsukuba, Japan.
 36. Harrison, R. y Vickers, S. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reprod. Fert.* 8: 343-352.
 37. Henry, M., Noiles, E., Gao, D., Mazur, P. y Critser, J. 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the

- maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*. 60: 911-918.
38. Hernández PJE., Fernández R., Rodríguez S., Juárez R., Soto M., García R. 2012. Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Rev. Salud Anim* 34: 78-83.
 39. Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJ, Negrete RM, Soto MY, García RA. Efecto de la criopreservación de semen de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal. *Rev Salud Anim* 34: 188-191.
 40. Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJ, Soto MY, Verona JE, García RA. 2012. Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim* 34: 84-88.
 41. Huanca, W. y Adams, G. 2007. Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, Youngquist R and Threlfall W. 2° Edition Saunders. Elsevier Inc. p 869-873.
 42. Huo, L. 2002. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, and capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*. 58: 1349-1360.
 43. James, A., Green, H., Hoffman, S., Landry, A., Paccamonti, D. y Godke, R. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*. 58:401-404.
 44. Januskauskas A, Johannisson L, Soderquist, Rodríguez-Martínez H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53: 859-875.
 45. Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraes, P., Mann, T., Lutwak Mann, C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. New York, Springer-Verlag.
 46. Karabinus, D., Evenson, D., Kaproth, M. 1991. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *Journal Dairy Sci*. 74: 3836-3848.
 47. Leyva, V., Franco, E. y Sumar, J. 1977. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. En: I Reunión Cient. Anual de la Asoc. Peruana de Prod. Animal. Lima.
 48. Lichtenwainer, A., Woods B., G. and Weber, J. 1996. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46: 293-305.
 49. Martinez-pastor, F., Johannisson, A., Gil, J. (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma

- membrane to evaluate frozen thawed ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 1-2:121-133.
50. McEvoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *Journal Reprod. Fert.* 9 (48): (Abstr).
 51. Membrillo, A., Córdova, A., Hicks, J., Olivares, I., Martinez, V. y Valencia J. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Journal Cell. Sci.* 131: 224-238.
 52. Mogrovejo D., 1952. Estudios del semen de la alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad Medicina Veterinaria UNMSM. 67 p.
 53. Moore, A., Squires, E. Bruemmer J. y Graham, J. 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal Equine Vet. Sci.* 26: 215-218.
 54. Morel, M. 1999. Equine artificial insemination. CABI Publishing New York. 406p.
 55. Mortimer S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Repr. Update* 3(5): 403-439.
 56. Morton KM, Bathgate R, Evans G, Maxwell WMC. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate based, Tris-based and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fert Dev* 19: 792-796.
 57. Morton KM, Evans G, Maxwell WM. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74: 311-316. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.015.
 58. Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela-Fernández, E., Gallardo-Bolaños, J. 2008. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *Journal Androl.* 29 (2): 213-21.
 59. Pacheco, C. 1996. Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca. Tesis MVZ. Arequipa: Universidad Católica de Santa María, Arequipa. 52 p.
 60. Palacios, C. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Memorias posgrado de reproducción bovina CGR Colombia.
 61. Palma GA. 2001. Producción in vitro de embriones. En: palma GA. Primera edición Biotecnología de la Reproducción.
 62. Patrat C, Serres C, Jouannet P. 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell.* 92: 255-266. doi: 10.1016/S0248-4900(00)01072-8

63. Peña, A.; C. Linde-Forsberg. 2000. Effect of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
64. Peterson, N. y Freund, M. 1970. ATP synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* (3): 47-54.
65. Perez E. 2009. Effect of glutathione on ovine cryopreserved sperm function and oxidative status. Tesis Médico Veterinario. Sao Paulo. Universidad de São Paulo. 60 p.
66. Pérez, M., Apaza, E. y Deza, H. 2006. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. En 11mo simposio internacional de investigación sobre camélidos sudamericanos. Arequipa- Perú. p 221.
67. Peña, F., Rodriguez, H. 2006. Citometria de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozide porcino. En: Manual de Tecnicas de Reproducción Asistida en Porcinos. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. p: 133-143.
68. Quispe, E. 2005. Mejoramiento genético y medioambiental de alpacas en la región de Huancavelica. En: Proyecto de inversión pública a nivel de perfil. Huancavelica.
69. Quispe E., Mueller J., Ruiz J., Alfonso L., y Gutiérrez G. 2009. Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos. 1era ed. Huancavelica, Perú. p. 93 - 112.
70. Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD. 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 67: 1043- 1051. doi: 10.1095/biolreprod.102.005967
71. Risopatrón J, Peña P, Miska W, Sánchez R. 2001. Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. *Andrologia* 33: 63- 67. doi: 10.1046/j.1439-0272.2001.-00405.x
72. Robaire B. y Viger R. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.* 52: 226-236.
73. Santiani A, Evangelista S, Sepúlveda N, Risopatrón J, Villegas, Sánchez R. 2014. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 82: 884- 889. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.002.

74. Santiani A., Evangelista S., Valdivia M., Risopatrón J., Sanchez R. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79: 842-846. doi: 10.1016/j.theriogenology.- 2012.12.012
75. Santiani A., Huanca W, Sapaná R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal Androl.* 7 (3): 303-309.
76. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista S, Choez K, Pacheco J. 2015. Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. *Anim. Reprod. Sci.* 5(1): 87-92
77. Santiani A., Ugarelli A., Evangelista S. 2016. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 173: 49-55.
78. San Martín M. 1961. Fisiología de la reproducción de la alpaca. *Anim. Symp. Sobre problemas ganaderos.* Peru, pp 121- 131.
79. San Martín M, Copaira M, Zuñoga J., Rodríguez R., Bustinza G. Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal Reprod. Fertility.* (16): 395-399
80. Siciliano L, Marciano V, Carpino A. 2008. Prostate-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 5. doi: 10.1186/1477-7827-6-5
81. Silva, A., Cardoso, R., Uchoa, D. y Silva, L. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59: 821-829.
82. Silva P, Gadella B. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.010
83. Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C. y Stornelli, M. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Facultad de Ciencias de veterinaria, Universidad Nacional de La Plata. Argentina. p. 28-35
84. Sumar, J. y Leyva, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca. En: IV Conv. Int. en camélidos sudamericanos.
85. Thomas, C., Garner, D., Dejarnette, J. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58: 786-793.
86. Ugarelli A., Evangelista S., Santiani A. 2017. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de

87. Ugarelli A., Evangelista S., Choez K, Pacheco J, Santiani A. 2015. Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. *Spermova* 5: 87-92. doi: 10.18548/aspe/0002.20
88. Urquieta, B., Cepeda, R., Cáceres, J., Raggi, L., Rojas, J. 1991. Seasonal variation in some reproductive parameters of male vicuña in the High Andes of northern Chile. *Interregional network for improving the productivity of camelids*. 17-20 June, Rabat Institute, Maroc 115-122.
89. Valdivia M, Ruiz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzales A, Manosalva I, Ponce C, Olazábal J, Dávalos R. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En *II congreso Mundial sobre camélidos*, Cusco.
90. Vaughan, J., Galloway, D. y Hopkins, D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Kingston, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation. 90 p.
91. Wang, X., Wang L. y Liu, X. 2003. The quality and processing performance of alpaca fibres. *Australian alpaca fibre industry and the fibre properties*. p 128. Disponible en <http://www.rirdc.gov.au/reports/RNF/03>.
92. Xungai W., Lijing W., y Xiu L. 2003. The quality and processing performance of alpaca fibres. *Rural industries research and development corporation*. 128 (3). p 119.
93. Yu, I., Songsasen, N., Godke, R. 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62-78.